

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinske laboratorijske
dijagnostike**

Sara Kević Dešić

**ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOG
UČINKA TERPENTINA PRIMJENOM
MIKRONUKLEUS TESTA**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinske laboratorijske
dijagnostike**

Sara Kević Dešić

**ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOG
UČINKA TERPENTINA PRIMJENOM
MIKRONUKLEUS TESTA**

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je napravljen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc.dr.sc. Jasenka Wagner

Rad ima 32 lista, 4 tablice i 8 slika.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasenki Wagner na pomoći i sugestijama tijekom istraživanja i izrade završnog rada, te Ivani Škrlec i Saneli Štibi na iskazanoj potpori, strpljenju i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno majci i suprugu na potpori, odricanju i razumijevanju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. TERPENTIN	1
1.1.1. Upotreba terpentina	1
1.1.2. Poznati učinci terpentina	2
1.2. MIKRONUKLEUS TEST	2
1.2.1. Vrste mikronukleus testa	3
1.2.2. Mikronukleus	4
1.2.3. Nastanak mikronukleusa	4
1.2.4. Normalne i granične vrijednosti mikronukleusa u hrvatskoj populaciji	5
1.2.5. Primjena MN testa u biološkom nadzoru	6
2. HIPOTEZA	7
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	8
4. ISPITANICI I METODE	9
4.1. USTROJ STUDIJE	9
4.2. ISPITANICI I KONTROLE	9
4.2.1. Ispitanici	9
4.2.2. Kontrolna skupina	10
4.3. METODE	11
4.3.1. Kemikalije i oprema	11
4.3.2. Kultivacija	12
4.3.3. Izrada	12
4.3.4. Priprema preparata	12
4.3.5. Analiza preparata	13
4.4. STATISTIČKE METODE	14
5. REZULTATI	15
5.1. STATISTIČKA PROVJERA PRIKLADNOSTI KONTROLNE SKUPINE	15
5.2. BROJ MN, NPM I NP, TE CBPI	16
5.3. DODATNE ANALIZE UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE	19
5.3.1. Izloženost samo terpentinu i izloženost drugim sredstvima uz terpenin	19
5.3.2. Izloženost terpentinu kroz različite vremenske periode	20
6. RASPRAVA	22

7. ZAKLJUČCI	25
8. SAŽETAK.....	26
9. SUMMARY	27
10. LITERATURA.....	28
11. ŽIVOTOPIS	31
12. PRILOZI.....	32

POPIS KRATICA

CBPI- indeks proliferacije stanice (eng. *cytokinesis-block proliferation index*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

HBSS- puferska otopina (eng. *Hank's buffered salt solution*)

FISH- fluorescentna in situ hibridizacija (eng. *fluorescent in situ hybridisation*)

MN-mikronukleus

NP- nuklearni pup

NPM- nukleoplazmatski most

PHA- fitohemaglutinin (eng. *phytohaemagglutinin*)

RI- indeks replikacije (eng. *replication index*)

RICC- relativan porast broja stanica (eng. *relative increase in cell count*)

RPD - relativno udvostručavanje stanica (eng. *relative population doubling*)

1.UVOD

Procjena genotoksičnih učinaka kemikalija provodi se na ljudskim limfocitima periferne krvi primjenom različitih genetičkih markera koji omogućuju detekciju ranih bioloških učinaka. Jedan od genetičkih markera je i broj mikronukleusa u binuklearnim stanicama (1). Poznato je da su displazije i premaligna stanja često praćena kromosomskom nestabilnosti i da su specifične kromosomske aberacije povezane s pojedinim tipovima raka. Kromosomske aberacije u limfocitima periferne krvi najosjetljiviji su biomarker za procjenu rizika od pojave raka, s obzirom na to da odražavaju rane biološke učinke genotoksičnih karcinogena na nasljedni materijal te individualnu osjetljivost prema nastanku raka (2). Osim broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova koji ukazuju na prisutnost dicentrika i broj nuklearnih pupova koji predstavljaju amplifikaciju gena (3), upućuju na biološke učinke koji prethode pojavi tumora, raka i različitih bolesti. U ovom istraživanju ispituje se genotoksični učinak terpentina.

1.1.TERPENTIN

Terpentin ($C_{10}H_{16}$) je prozirna, hlapljiva, bezbojna tekućina, gorkog okusa, karakterističnog mirisa, dobivena destilacijom smole koja se skuplja iz živog crnogoričnog drveća, prije svega bora, ariša ili cedra. Terpentin se sastoji većinom od monoterpena; alfa-pinena i beta-pinena sa manjim količinama karena, kamfena, dipentena i terpinolena (4). Nije topiv u vodi, ali se otapa u alkoholu, eteru i kloroformu (5). Iznimno je zapaljiv.

1.1.1.Upotreba terpentina

Terpentin je u primjeni u suvremenoj industriji, prvenstveno kao otapalo za boje na bazi ulja, posebno u likovnoj umjetnosti, ali i kao organsko otapalo u široj primjeni. Koristi se i kao sirovina za dobivanje zaštitnih lakova i voskova za drvo te kao sirovina u kemijskoj industriji. Također se koristi kao sirovina u proizvodnji kamfora. Kroz povijest se koristio u medicini, gdje je u smjesi sa životinjskom masti, korišten kao ljekovita mast, a i u današnje vrijeme je sastojak sličnih pripravaka za vanjsku primjenu. Korišten je čak i kao lijek za

crijevne parazite i kandidijaze, zahvaljujući svojim antiseptičnim i diuretičnim svojstvima (6,7). Danas se i dalje koristi u nekim homeopatskim pripravcima u alternativnoj medicini.

1.1.2. Poznati učinci terpentina

Do sada poznati štetni učinci terpentina na ljudsko zdravlje su brojni, a ovise o intenzitetu i načinu izloženosti. Tako se pri udisanju mogu javiti simptomi kao što su glavobolja, vrtoglavica, mučnina i povraćanje. Javlja se iritacija nosa i grla. Veće količine mogu izazvati pospanost, dezorijentaciju, gubitak svijesti, zatajenje disanja i smrt. U dodiru s kožom javljaju se crvenilo i peckanje kože koje se povlači nakon nekog vremena, a pri duljem izlaganju većim količinama može doći do pojave dermatitisa (suha, crvena, svrabljiva koža). Ako dođe do kontakta s očima, javljaju se crvenilo, suzenje i svrbež očiju. Prilikom gutanja ili povraćanja može doći i do oštećenja pluća, a kod gutanja većih količina dolazi do vrtoglavice, mučnine, povraćanja, zatajenja bubrega i smrti (8,9,10,11). Unatoč svim navedenim poznatim štetnim učincima, nije poznato je li terpentin mutagen ili karcinogen (8). Ovim istraživanjem ispituje se upravo taj genotoksični potencijal terpentina s obzirom na još uvijek veliku izloženost ljudi u profesionalnom okruženju, prije svega terpentinskim parama.

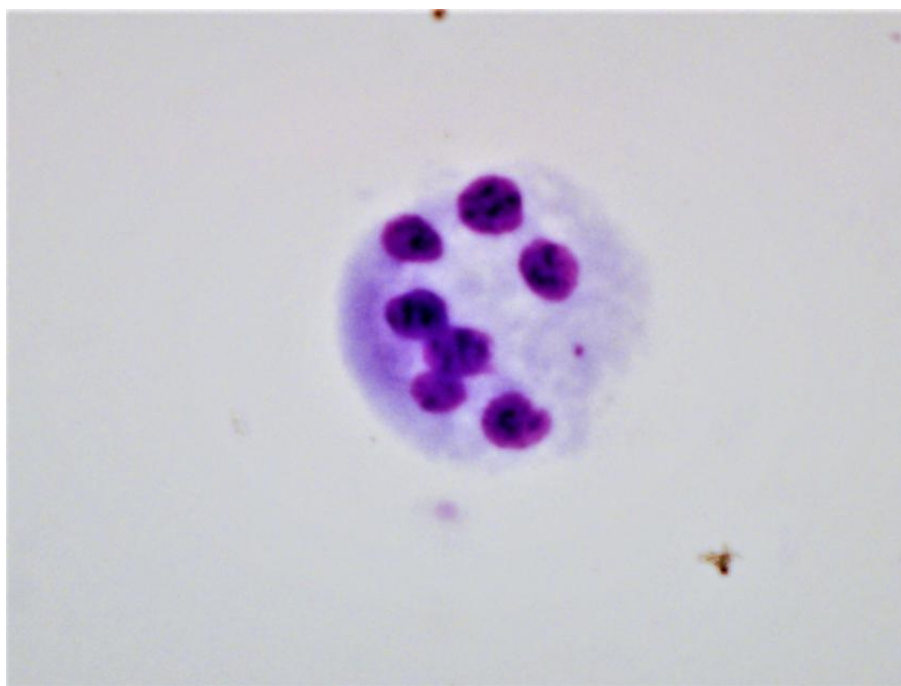
1.2. MIKRONUKLEUS TEST

Mikronukleus (MN) test na limfocitima periferne krvi jedna je od najvažnijih metoda koja se primjenjuje u biološkom nadzoru. Usavršavanjem i razvitkom MN testa porasla je i količina znanja o prednostima i osjetljivosti te metode, što potpuno opravdava njezino uvođenje u standardnu primjenu za biološki nadzor izloženih populacija (1). Posljednjih je godina u okviru međunarodnog projekta HUMN (eng. HUMAN MicroNucleus) provedena standardizacija MN testa te su prepoznati čimbenici koji mogu utjecati na njegove rezultate. MN test je jednostavniji i brži od analize kromosomskih aberacija, a pregledavanjem velikog broja stanica (najmanje 1000 stanica po ispitaniku) postiže se i veća statistička značajnost. Osim navedenog, u ovome se testu može istodobno utvrditi ukupni broj MN, ukupni broj stanica s MN, raspodjela MN u stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova (NPM) i

nuklearnih pupova (NP) u uvjetima in vitro što ga trenutačno čini jednim od najsvestranijih citogenetičkih testova (1,12). Za određivanje citotoksičnosti računa se indeks proliferacije stanica (CBPI) na 500 stanica. CBPI je broj koji prikazuje diobu stanica kod ispitanika u odnosu na kontrolu. Računa se prema sljedećoj formuli:

$$CBPI = \frac{br.mononukl.st. + (2 \times br.binukl.st.) + (3 \times br.trinukl.st.) + (4 \times br.multinukl.st.)}{ukupan broj stanica}$$

MN test ima prednost pred drugim metodama jer se osim razine ukupnog oštećenja kromosoma i/ili diobenog vretena može utvrditi i podrijetlo pojedinačnih mikronukleusa. U tu svrhu može se primijeniti C-pruganje (13), imunofluorescencijske tehnike s antikinetoornim protutijelima, te fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) s probama koje specifično detektiraju centromerna ili telomerna područja kromosoma. Općenito se smatra da mikronukleusi nastali od zaostalih kromosoma imaju kinetohore, dok oni koji ne sadržavaju kinetohoru ili centromernu DNA obično sadržavaju acentrične fragmente (14).



Slika 1. Multinuklearna stanica (ispitanik 07)

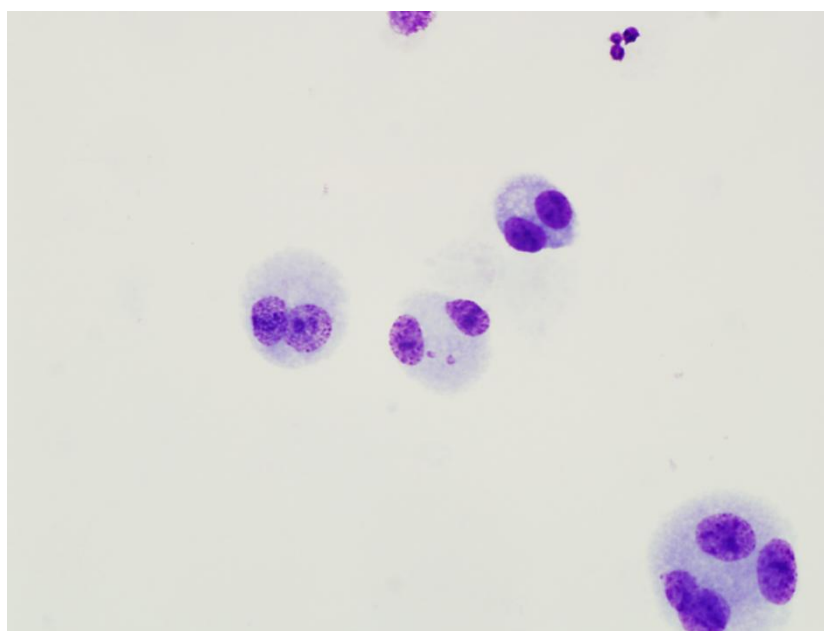
1.2.1. Vrste mikronukleus testa

Najvažnija stavka u izvođenju MN testa je završena mitoza tijekom ili poslije inkubacije stanica te stoga postoje dvije mogućnosti izvođenja MN testa, uz prisutnost citohalazina B i bez njega. Nakon diobe stanične jezgre, u uvjetima in vitro radi sprječavanja

diobe citoplazme dodaje se citohalazin B. Citohalazin B je inhibitor koji blokira citokinezu (diobu citoplazme) prije nego li se roditeljska stanica podijeli u dvije stanice kćeri, na način da sprječava polimerizaciju aktina u mikrofilamente. MN test sa citohalazinom B pruža točnije i pouzdanije određivanje citotoksičnosti. CBPI je preporučena vrijednost za usporedbu citotoksičnosti kulture stanica ljudi izloženih ispitivanom agensu (ispitanika) u odnosu na kontrolnu skupinu. U slučaju kada se citohalazin B ne dodaje u ispitivanu kulturu, računa se RPD (relativno udvostručavanje stanica) i RICC (relativan porast broja stanica) (15).

1.2.2. Mikronukleus

Mikronukleus je samostalna kromatinska struktura koja je potpuno odvojena od jezgre (Slika 2). Izgleda poput dodatne samostalne jezgre smještene unutar citoplazme, ali znatno manje veličine koja mora biti između $1/16$ i $1/3$ promjera jezgre te istog obojenja kao i jezgra (1). Nastaje kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri.



Slika 2. Mikronukleus (2) u binuklearnoj stanici (kontrolni ispitanik 13)

1.2.3. Nastanak mikronukleusa

Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (16). Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog

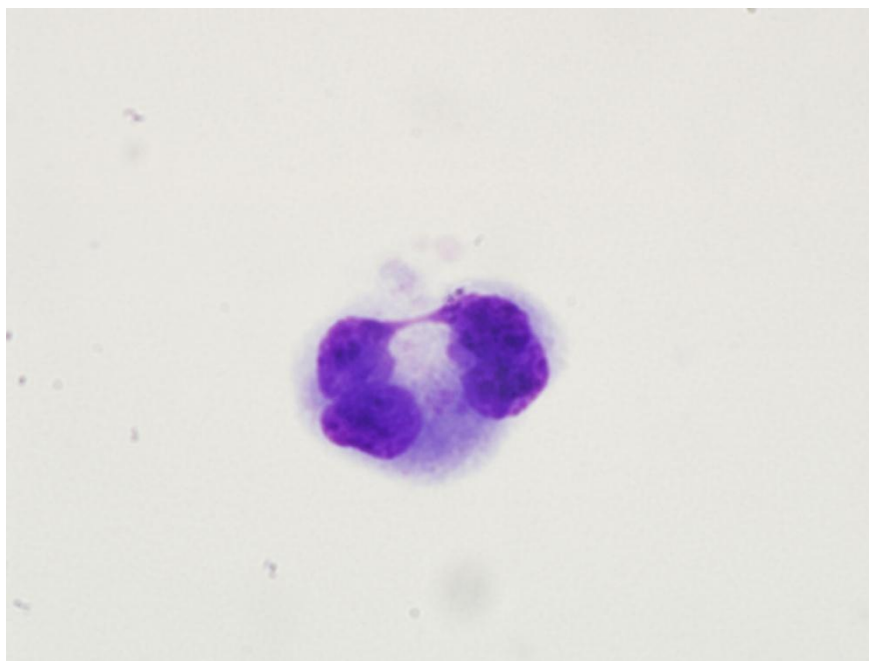
organizma na dva načina: Prvi je aneugeni učinak – nakon što stanica uđe u diobu zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali će kromosomi u citoplazmi stanice kćeri kondenzacijom formirati mikronukleuse (17). Drugi je klastogeni učinak – mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma. Spontanom nastanku mikronukleusa doprinose mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma ili gubitak čitavih kromosoma tijekom anafaze i nepopravljene kromosomske lomove koji dovode do stvaranja acentričnih ulomaka, a nastaju djelovanjem endogenih čimbenika ili pod vanjskim utjecajem (18). Istraživanja podrijetla mikronukleusa, koji spontano nastaju u humanim limfocitima, pokazala su da ih 50% potječe od čitavih kromosoma zaostalih u anafazi mitoze (17). Međutim, kvantifikacija mikronukleusa ne govori o mehanizmima koji su doveli do njihova nastanka te su potrebna daljnja ispitivanja koja određuju sadržaj mikronukleusa (npr. metoda C- pruganja).

1.2.4. Normalne i granične vrijednosti mikronukleusa u hrvatskoj populaciji

Povećani broj mikronukleusa u pojedinca može značiti njegovu povećanu osjetljivost na karcinogene tvari, rezultat izloženosti genotoksičnim tvarima tijekom razdoblja razvoja stanica u ispitivanom tkivu, no može upućivati i na pojačanu tjelesnu aktivnost, učinke prehrane i drugo (19,20). Istraživanjem provedenim u općoj populaciji Hrvatske utvrđeno je prosječno 7 MN dok je raspon pojedinačnih vrijednosti iznosio od 0 do 18 MN u 1000 binuklearnih stanica. Gornja granična vrijednost dobivena istraživanjem iznosi 12,5 MN na 1000 limfocita (12). Međutim, u navedenom istraživanju rezultati su dobiveni za opću populaciju, gdje je dob ispitanika bila u rasponu 20-62 godine, što posljedično povećava srednju vrijednost MN, ako uzmemo u obzir činjenicu da je dob jedan od važnijih faktora, odnosno da je dokazano kako se broj MN povećava u skladu sa starosti ispitanika (12,21). Zbog toga je za istraživanja koja se fokusiraju na ciljnu, izoliranu populaciju, potrebno napraviti i odgovarajuću kontrolnu skupinu, koja će odgovarati ispitivanoj skupini po dobi, ali i po spolu i životnim navikama.

1.2.5. Primjena MN testa u biološkom nadzoru

Mikronukleus test je vrlo koristan jer predstavlja rane pokazatelje potencijalnog rizika izloženosti. Raznim istraživanjima pokazano je da je povećani broj kromosomskih nepravilnosti u ljudskim tkivima statistički povezan s rizikom od nastanka zloćudnog tumora (1,22). Primjenom mikronukleus testa može se utvrditi štetan utjecaj navedenih kemikalija te kako i na koji način one utječu na profesionalno izloženu populaciju. Osim broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova (Slika 3) koji ukazuju na prisutnost dicentrika i broj nuklearnih pupova koji predstavljaju amplifikaciju gena, upućuju na biološke učinke koji prethode pojavi tumora i različitih zloćudnih bolesti. Upravo iz tih razloga mikronukleus test se upotrebljava u biološkom nadzoru kao dio zdravstvenog nadzora osoba koje su profesionalno izložene različitim fizikalnim i kemijskim mutagenima ili kancerogenima. Osobitu važnost ima u praćenju populacija koje su profesionalno izložene pojedinim mutagenima iz radnog okoliša, čiji su mehanizmi djelovanja poznati, a dovode se u izravnu vezu s malignom transformacijom i pojavom raka (2).



Slika 3. Binuklearna stanica sa nukleoplazmatskim mostom (ispitanik 15)

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da terpentini uzrokuju nastanak većeg broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama kod ljudi svakodnevno izloženih isparavanjima terpentina.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati koliki je genotoksičan učinak terpentina na nastanak mikronukleusa u binukleranim limfocitima periferne krvi
2. Ispitati citotoksičan učinak terpentina izračunavanjem indeksa proliferacije

4. ISPITANICI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Kohortna studija

4.2. ISPITANICI I KONTROLE

4.2.1. Ispitanici

Ispitanici u ovom istraživanju su osobe svakodnevno izložene terpentinskim parama, odnosno, studenti Odsjeka za likovnu umjetnost, pri Umjetničkoj akademiji u Osijeku, na Sveučilištu J.J.Strossmayera u Osijeku. Studenti likovne umjetnosti redovno su izloženi terpentinu koji se koristi kao otapalo za uljane boje. Za potrebe ovog istraživanja dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva za istraživanja Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek, kao i odobrenje dekana Umjetničke akademije, te voditelja Odsjeka za likovnu umjetnost, za sudjelovanje studenata u ovom istraživanju. Ispitanici su svojevolumno pristupili istraživanju, pri čemu su upoznati sa ciljevima i metodologijom istraživanja (Prilog 1), a uz potpis informiranog pristanka (Prilog 2) za uzorkovanje. Ispitanici su ispunjavali i upitnik o životnim navikama i okolnostima (Prilog 3), čija je analiza osigurala da su ispitanici u skladu sa kriterijem uključivanja, odnosno isključivanja iz istraživanja.

Kriteriji za uključivanje u skupinu ispitanika:

- osobe mlađe od 40 godina
- izloženost terpeninu
- neizloženost ionizirajućem zračenju posljednjih 6 mjeseci

Kriteriji za isključivanje:

- stariji od 40 godina
- neizloženost terpentinu

- izloženost ionizirajućem zračenju posljednjih 6 mjeseci
- korištenje antibiotika posljednjih mjesec dana

U istraživanju je sudjelovalo 22 ispitanika koji su zadovoljili zadane kriterije, a u odnosu na njih je formirana odgovarajuća kontrolna skupina.

4.2.2. Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu činit će osobe slične dobi, spola i životnih navika kao i ispitivana skupina uz uvjet da nisu izloženi terpentinu. Osobe u kontrolnoj skupini su također svojevolumno pristupile istraživanju, uz potpis informiranog pristanka i ispunjavanje upitnika o životnim navikama, kao i ispitanici, a na temelju čega je provjerena prikladnost kontrolne skupine.

Kriterij za uključivanje u kontrolnu skupinu:

- osobe mlađe od 40 godina
- neizloženost terpentinu
- neizloženost ionizirajućem zračenju ili nekom drugom kemijskom agensu

Kriterij za isključivanje iz kontrolne skupine:

- stariji od 40 godina
- izloženost terpentinu
- izloženost ionizirajućem zračenju ili nekom drugom kemijskom agensu
- korištenje antibiotika posljednjih mjesec dana

U istraživanju je sudjelovalo 20 osoba u kontrolnoj skupini, a čija je prikladnost naknadno provjerena statističkim metodama.

4.3. METODE

Prije početka istraživanja, od svih ispitanika zatražen je pristanak za sudjelovanje i potpisivanje informiranog pristanka. Ispitanici su ispunili upitnike o životnim navikama. Uzorak za istraživanje podrazumijeva i vađenje krvi za *in vitro* mikronukleus test. Krv je izvađena u epruvete sa Na-heparinom, od strane kvalificiranog medicinskog osoblja u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, u razdoblju od 8. studenog do 6. prosinca 2016. Godine. Istraživanje je provedeno na limfocitima periferne krvi. Svaki uzorak ispitanika od interesa kao i kontrola rađen je u duplikatu. Analiza mikronukleus testa rađena je prema internoj modifikaciji protokola koji je objavio HUMN project (1).

4.3.1. Kemikalije i oprema

Potrebne otopine, puferi i reagensi:

- Epruveta s Na-heparinom
- Medij F-10 Ham (EuroClone, kat. br. N6908-500ML)
- Fitohemaglutinin (PHA) (Gibco, kat. br. 1057-015)
- L-glutamin (Lonza, kat. br. 17-605C)
- Citohalazin-B (Sigma, kat. br. C2743-200UL)
- Fiksativ-metanol (Sigma, kat. br. 32213) i ledena octena kiselina (Sigma, kat. br. 27225)
- Gurr Buffer Tablets (Gibco, kat. br. 10582-013)
- Giemsa boja (Kemijsko tehnički laboratorij Šlaković)

Potrebna oprema:

- Sterilni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (Uniflow aura-VF72 laminar)
- Eppendorf pipete od 200 µl i 1000 µl
- Sterilni filter nastavci za pipete od 200 µl i 1000 µl
- Inkubator (Mettler)
- Centrifuga (Eppendorf 5804)
- Digestor
- Vakuum sisaljka
- Pasteur plastične pipete od 3 ml

- Predmetna stakla
- Svjetlosno-fluorescentni mikroskop s kamerom (Zeiss Axioskop2 MOT)
- DPC Controller 1.2.1.108 (Olympus Optical) program za slikanje

4.3.2. Kultivacija

U svaku označenu epruvetu sa prethodno rastočenim medijem sobne temperature (5 ml u svakoj epruveti) dodaju se mitogeni: 30 μ l fitohemaglutinina i 60 μ l L-glutamina te oni stimuliraju diobu limfocita periferne krvi u *in vitro* uvjetima. U sterilnim uvjetima dodaje se 500 μ l krvi i inkubira u horizontalnom položaju na 37°C tijekom 44h. Nakon 44h dodaje se 3 μ l citohalazina-B koji inhibira citokinezu, odnosno diobu citoplazme, kako bismo dobili binuklearne stanice. Zatim se epruveta protrese i inkubira još 28h (do 72h).

4.3.3. Izrada

Nakon 72h kultivacije, epruvete se vade iz inkubatora, promiješaju i centrifugiraju 4 minute na 2000 rpm. Supernatant se odstranjuje sterilnom pipetom i ostavlja 0.5 ml taloga koji se razbija rukom kako bi se očuvala plazmatska membrana. Postupno se dodaje fiksativ (1:3 = ledena octena kiselina: metanol), a epruvete se ispiru nekoliko puta. Suspenzija stanica se ostavlja na +4°C do drugog dana.

4.3.4. Priprema preparata

Na suho predmetno staklo Pasteurovom plastičnom pipetom stavljaju se dvije kapi stanične suspenzije. Preparati se suše na sobnoj temperaturi preko noći, a zatim boje u 5% otopini Giemse u fosfatnom puferu 5 minuta nakon čega se 15 sekundi ispiru u destiliranoj vodi i suše na zraku u vertikalnom položaju.

4.3.5 Analiza preparata

Broj mikronukleusa može se utvrditi mikroskopskom analizom i pomoću protočnog citometra. U ovom istraživanju preparati su se analizirali svjetlosnim mikroskopom Axioskop 2 MOT Zeiss i programom za slikanje DP Controller 1.2.108. Olympus Optical Co. LDT (2002). Analizirano je po 1000 binuklearnih stanica. Na malom povećanju nije moguće vidjeti ima li mikronukleusa u binuklearnim stanicama, ali se može odrediti kvaliteta samog preparata i prikladnost za analizu, odnosno ima li dovoljno binuklearnih stanica sa citoplazmom za analizu. Nakon što se pronade binuklearna stanica pogodna za analizu, stavlja se na veće povećanje koristeći imerzijsko ulje ($400\times$ ili $1000\times$). Na tom povećanju potrebno je prosuditi je li stanica pogodna za analizu, odnosno je li slika oštra, vidi li se rub citoplazme, poklapaju li se jezgre te je li veličina mikronukleusa koja mora biti između $1/16$ i $1/3$ promjera jezgre odgovarajuće veličine, te istog obojenja kao i jezgra. Ako je binuklearna stanica dobra, zapisuje se broj mikronukleusa, koordinate stanice na predmetnom staklu u obrazac za mikroskopiranje te se slika DP Controller programom. Istovremeno se bilježi ako se u kojoj binuklearnoj stanici nađe nuklearni pup ili nukleoplazmatski most. Nukleoplazmatski most ne smije biti veći od $1/4$ jezgre, a mora biti obojen istim intenzitetom kao i jezgra. Za određivanje citotoksičnosti broji se ukupno 500 stanica te se određuje koliko ima jezgara u citoplazmi (jedna = mononuklearne stanice, dvije = binuklearne stanice, tri = trinuklearne stanice te više od tri = multinuklearne stanice).



Slika 4. Svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT Zeiss za analizu preparata

4.4. STATISTIČKE METODE

Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom deskriptivne statistike, neparametrijskog Mann-Whitney U-testa i Kruskal-Wallis ANOVA-testa sadržanih u programskom paketu Statistica 12.0 (StatSoft Inc. TULSA, OK, USA). Numerički podaci dani su kao minimum i maksimum, srednja vrijednost i standardna devijacija, sve P vrijednosti su dvostrane, a razina značajnosti postavljena je na $\alpha < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. STATISTIČKA PROVJERA PRIKLADNOSTI KONTROLNE SKUPINE

Rezultati ovog istraživanja procjenjuju se u odnosu na kontrolnu skupinu, zbog čega je važno da je kontrolna skupina odgovarajuća, odnosno da je slična ispitivanoj skupini po svim faktorima koji mogu utjecati na rezultate, osim po izloženosti terpentinu.

Tablica 1. Rezultati statističke provjere prikladnosti kontrolne skupine; Mann-Whitney U test; $\alpha < 0,05$

Faktor koji može utjecati na rezultat MN-testa	Skupina	Min-max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	P -vrijednost
Spol	Kontrolna	0-1	0,5500	$\pm 0,51042$	<u>0,131</u>
	Ispitanici	0-1	0,7727	$\pm 0,42893$	
Dob	Kontrolna	18-28	21,6500	$\pm 3,03098$	<u>0,011</u>
	Ispitanici	20-26	23,2727	$\pm 1,88179$	
Navika pušenja	Kontrolna	0-1	0,4000	$\pm 0,50262$	<u>0,953</u>
	Ispitanici	0-1	0,4091	$\pm 0,50324$	
Povijest Ca	Kontrolna	0-1	0,600	$\pm 0,50262$	<u>0,130</u>
	Ispitanici	0-1	0,3636	$\pm 0,42397$	

Iz Tablice 1. vidljivo je da između ispitanika i kontrolne skupine nema statistički značajne razlike po spolu, navikama pušenja i povijesti karcinoma u obitelji što su bitni faktori u nastanku mikronukleusa. Pokazala se statistički značajna razlika u dobi ispitanika, ali je u ovom slučaju zanemariva zbog malog uzorka, kao i zbog ranijih istraživanja koja su pokazala da nema razlike u pojavnosti MN u odnosu na dob, u dobnoj skupini do 30 godina starosti (21), a u kojoj se nalaze svi ispitanici, kao i kontrole.

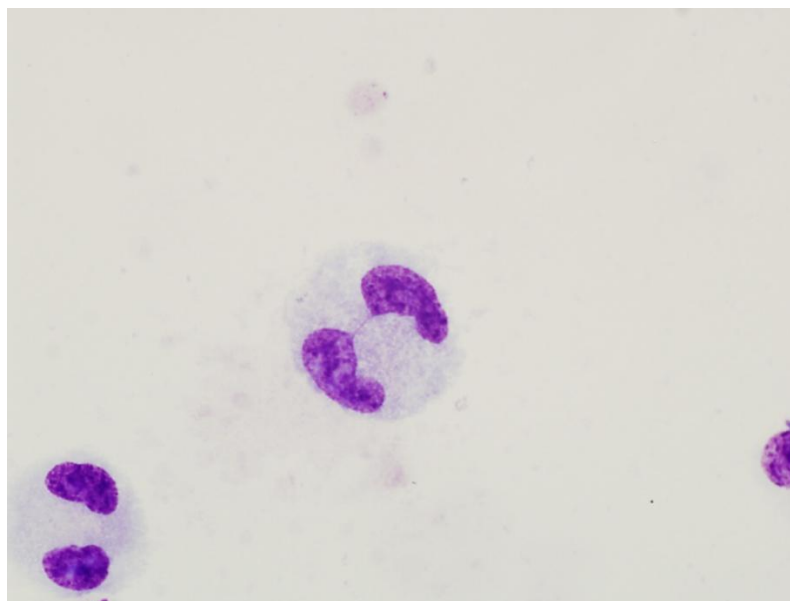
5.2. BROJ MN, NPM I NP, TE CBPI

Tablica 2. Rezultati MN testa sa posebno prikazanim pojedinim parametrima genotoksičnosti te zbroj svih parametara i CBPI kao pokazatelj citotoksičnosti; Mann-Whitney *U* test; $\alpha < 0,05$

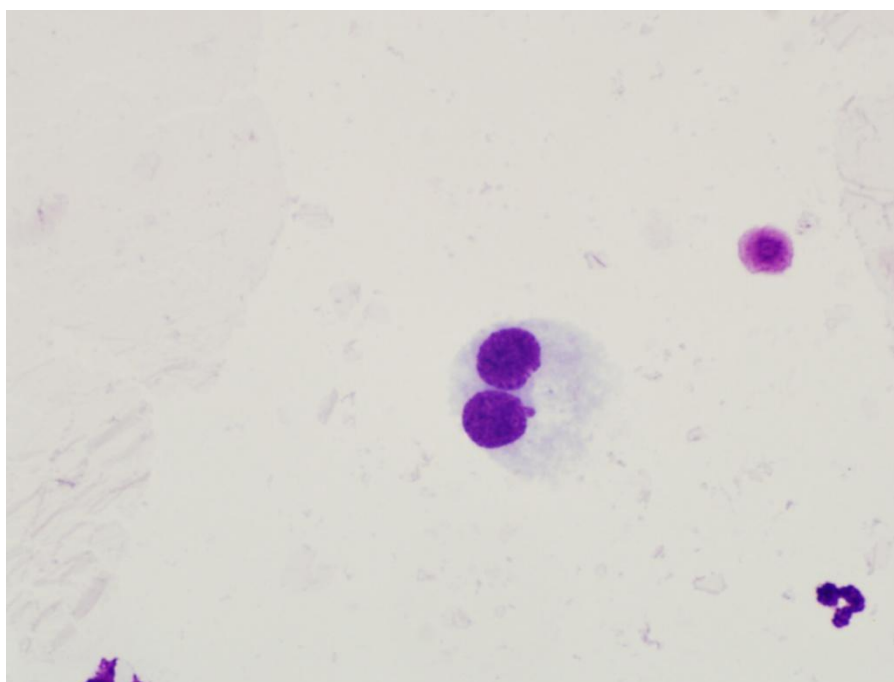
Mjereni parametar	Skupina	Min-max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	<i>P</i> -vrijednost
Broj MN	Kontrolna	0-5	1	$\pm 1,45095$	<u>0,000</u>
	Ispitanici	0-22	8,5909	$\pm 5,94145$	
Broj NPM	Kontrolna	0-2	0,15	$\pm 0,48936$	<u>0,013</u>
	Ispitanici	0-8	0,9545	$\pm 1,78558$	
Broj NP	Kontrolna	0-2	0,35	$\pm 0,67082$	<u>0,002</u>
	Ispitanici	0-16	3,5	$\pm 4,51189$	
Zbroj MN+NPM+NP	Kontrolna	0-5	1,5	$\pm 1,70139$	<u>0,000</u>
	Ispitanici	0-35	13,0455	$\pm 9,72222$	
CBPI	Kontrolna	1,78-2,48	2,2386	$\pm 0,19041$	<u>0,000</u>
	Ispitanici	2,25-3,11	2,6849	$\pm 0,22282$	

MN-mikronukleus; NPM-nukleoplazmatski most; NP-nuklearni pup; CBPI-indeks proliferacije sa zaustavljanjem citokineze

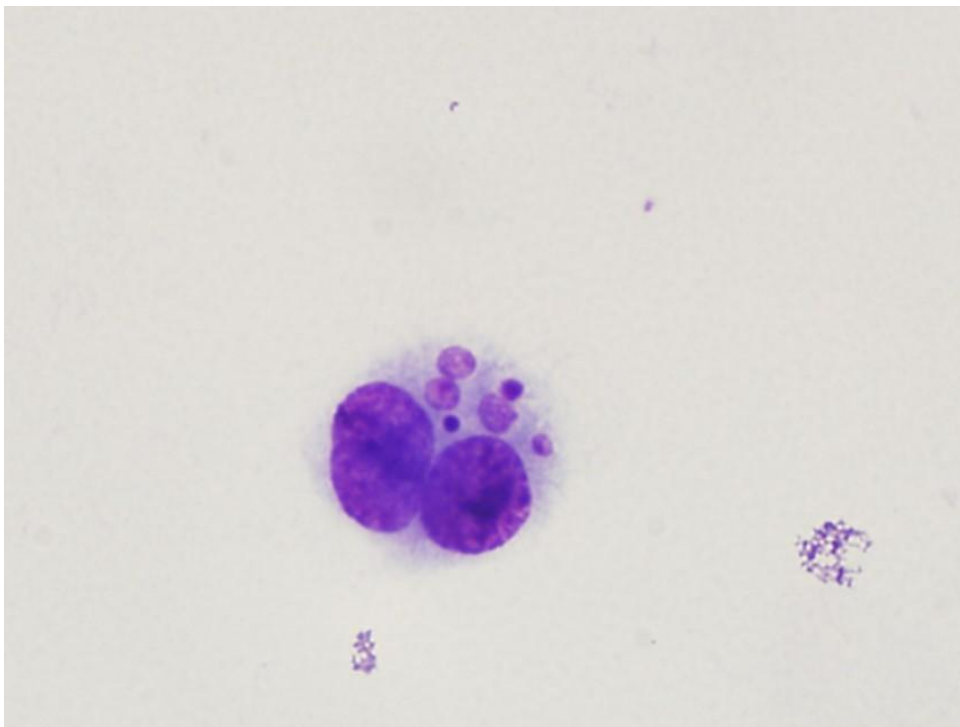
Iz Tablice 2. vidljivo je da postoji statistički značajna razlika između ispitanika i kontrola po svim mjerenim parametrima genotoksičnosti, kao i statistički značajna razlika u citotoksičnosti prema CBPI.



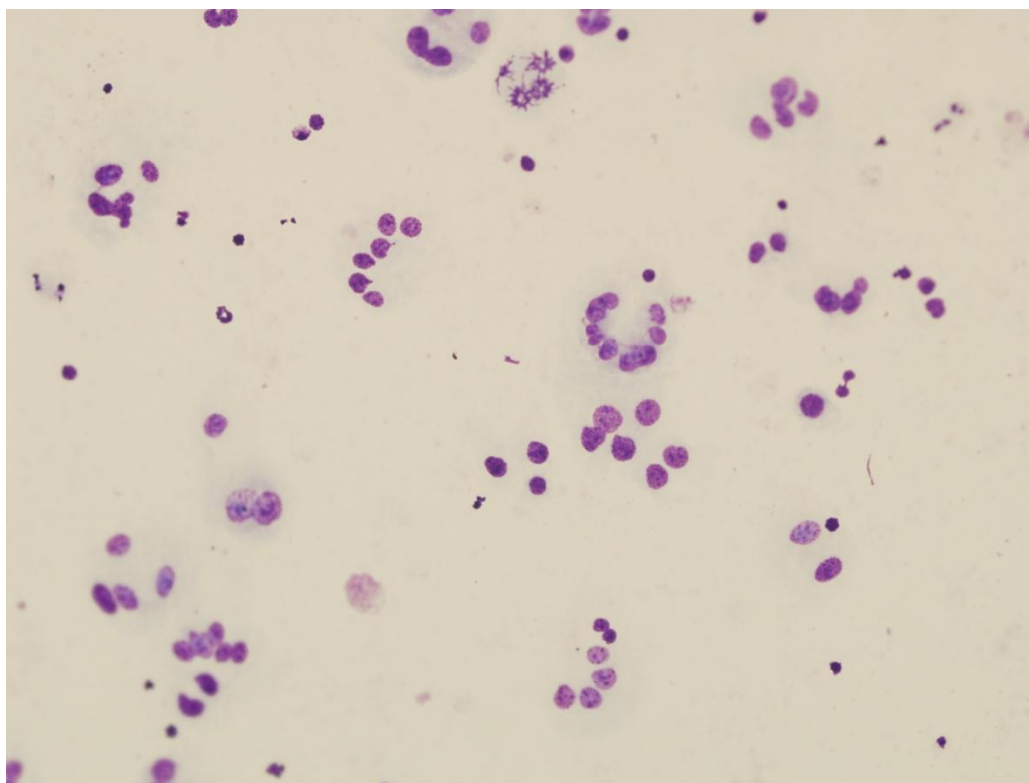
Slika 5. Nukleoplazmatski most u binuklearnoj stanici (ispitanik 07)



Slika 6. Nuklearni pup u binuklearnoj stanici (ispitanik 08)



Slika 7. Binuklearna stanica sa 6 mikronukleusa (ispitanik 15)



Slika 8. Stanice sa različitim brojem jezgri (ispitanik 06)

5.3. DODATNE ANALIZE UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE

Unutar ispitivane skupine je tijekom istraživanja zabilježeno da su neki ispitanici u svojem radu bili izloženi još nekim kemikalijama koje su mogle potencijalno utjecati na rezultat (dušična kiselina i nitro-razrjeđivač), pa je provjereno postoji li statistički značajna razlika u rezultatima ispitivanja genotoksičnosti po svim parametrima, kao i citotoksičnosti između ispitanika koji su bili izloženi samo terpentinu i ispitanika koji su koristili i druga sredstva. Također, uočeno je da nisu svi ispitanici bili jednako dugo izloženi terpentinu pa je napravljena analiza na osnovu vremenske izloženosti.

5.3.1. Izloženost samo terpentinu i izloženost drugim sredstvima uz terpentin

Tablica 3. Rezultati analize između ispitanika izloženih isključivo terpentinu i ispitanika izloženih drugim sredstvima; Mann-Whitney U test; $\alpha < 0,05$

Mjereni parametar	Skupina	Min-max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	P -vrijednost
Broj MN	Terpentin	0-18	8,5714	$\pm 6,9727$	<u>0,945</u>
	Terpentin i druga sredstva	1-22	8,6	$\pm 5,6669$	
Broj NPM	Terpentin	0-8	1,7142	$\pm 2,8702$	<u>0,447</u>
	Terpentin i druga sredstva	0-3	0,6	$\pm 0,9102$	
Broj NP	Terpentin	0-12	3,5714	$\pm 4,8599$	<u>0,945</u>
	Terpentin i druga sredstva	0-16	3,4666	$\pm 4,5176$	
Zbroj MN+NPM+NP	Terpentin	0-33	13,8571	$\pm 11,5387$	<u>1,000</u>
	Terpentin i druga sredstva	1-35	12,6666	$\pm 9,1781$	
CBPI	Terpentin	2,29-2,78	2,6177	$\pm 0,1681$	<u>0,368</u>
	Terpentin i druga sredstva	2,25-3,11	2,716	$\pm 0,2429$	

MN-mikronukleus; NPM-nukleoplazmatski most; NP-nuklearni pup; CBPI-indeks proliferacije sa zaustavljanjem citokineze

Prema Tablici 3. Vidljivo je da nema statistički značajne razlike u rezultatima mjerenja genotoksičnosti kao i citotoksičnosti između ispitanika koji su bili izloženi isključivo terpentinu i onih koji su uz terpentin u radu koristili i druga sredstva.

5.3.2. Izloženost terpentinu kroz različite vremenske periode

Prilikom analize upitnika ispitanika, uočeno je da nisu svi ispitanici bili jednako dugo izloženi terpentinu, stoga je napravljena analiza dobivenih rezultata u ovisnosti o vremenskoj izloženosti terpentinu. Ispitanici su podijeljeni u 3 skupine, gdje se u skupini 1 nalaze ispitanici koji su bili najkraće izloženi (manje od jedne godine), u skupini 2 su ispitanici koji su bili srednje izloženi (jedna do dvije godine), te u skupini 3, ispitanici koji su bili izloženi najviše terpentinu (2 godine i više).

Tablica 4. Analiza rezultata ovisno o vremenskoj izloženosti ispitanika terpentinu;
Kruskal Wallis Test; $\alpha < 0,05$

Mjereni parametar	Skupina	Min-max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	P-vrijednost
Broj MN	1	0-2	1	± 1	<u>0,038</u>
	2	6-11	8,333	$\pm 2,1566$	
	3	1-22	10,065	$\pm 5,8818$	
Broj NPM	1	0-2	0,666	$\pm 1,1547$	<u>0,948</u>
	2	0-2	0,666	$\pm 1,1547$	
	3	0-8	1,0625	$\pm 2,0155$	
Broj NP	1	0-1	0,333	$\pm 0,5770$	<u>0,012</u>
	2	0	0	± 0	
	3	0-16	4,75	$\pm 4,725$	
Zbroj MN+NPM+NP	1	0-4	2	± 2	<u>0,028</u>
	2	8-11	9	$\pm 1,7320$	
	3	1-35	15,875	$\pm 9,7561$	
CBPI	1	2,292-2,52	2,4253	$\pm 0,1188$	<u>0,032</u>
	2	2,252-2,862	2,6213	$\pm 0,3247$	
	3	2,406-3,112	2,7468	$\pm 0,1888$	

MN-mikronukleus; NPM-nukleoplazmatski most; NP-nuklearni pup; CBPI-indeks proliferacije sa zaustavljanjem citokineze

U Tablici 4. Prikazano je kako postoji statistički značajna razlika u rezultatima ispitanika ovisno o vremenskoj izloženosti terpentinu za sve mjerene parametre, osim za broj nukleoplazmatskih mostova.

6. RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja, posebna je pažnja posvećena formiranju kontrolne grupe koja će odgovarati ispitivanoj grupi, posebno u odnosu na dob, spol, navike pušenja kao i povijest karcinoma u obitelji, koji dokazano mogu utjecati na broj MN (12,21). Iako postoje podaci o srednjoj ($=7$) i graničnoj vrijednosti ($=12,5$) MN za opću hrvatsku populaciju, oni nisu korišteni kao referentna točka u ovom istraživanju, iz razloga što su u navedenom istraživanju ispitanici većinom bili bitno stariji od ispitivane skupine u ovom istraživanju, što ima bitan utjecaj na broj MN. U navedenom istraživanju je dobivena statistički značajna razlika između svih dobnih skupina (od 20 do 30; od 31 do 40; od 41 do 50; od 51 do 61), pa prema tome, vrijednosti dobivene za opću hrvatsku populaciju ne odgovaraju kao referentna točka za ovo istraživanje (12). U statističkoj procjeni prikladnosti kontrolne grupe, pokazano je da nema statistički značajne razlike u spolu, navikama pušenja i povijesti karcinoma u obitelji između kontrolne skupine i ispitanika, što kontrolnu skupinu čini odgovarajućom referentnom točkom za procjenu rezultata dobivenih iz uzoraka ispitanika (Tablica 1.). U statističkoj procjeni, pokazala se statistički značajna razlika u dobi između kontrolne skupine i ispitanika, ali je ona u ovom slučaju zanemariva jer svi pripadaju istoj dobnoj skupini, do 30 godina, gdje je dokazano ranijim istraživanjima da dob nema veliki utjecaj na broj MN do te dobi (12,21) pa je unatoč statistički značajnoj razlici, ta razlika u ovom istraživanju zanemariva.

Ovim istraživanjem potvrđena je hipoteza da terpentin uzrokuje nastanak većeg broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama kod ljudi svakodnevno izloženih isparavanjima terpentina. Uz same vrijednosti MN, također je dokazano da izlaganje terpentinskim parama može uzrokovati veći broj nuklearnih pupova, kao rezultat amplifikacije gena, te veći broj nuklearnih mostova kao rezultat stvaranja dicentrika (3). Za sve navedene parametre koji upućuju na genotoksičan učinak, dobivena je velika statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Također se pokazala statistički značajna razlika u procjeni citotoksičnog učinka terpentina, izračunavanjem CBPI što pokazuje antiproliferativni učinak terpentina (Tablica 2.). U istraživanju provedenom u južnoj Indiji, ispitanici su bili radnici u tekstilnoj industriji, gdje su kao izolirana populacija, profesionalno izloženi raznim toksičnim bojama, izbjeljivačima, solima, kiselinama, lužinama i teškim metalima, te raznim organskim otapalima i fiksativima koji se koriste za bojanje tkanina. U navedenom istraživanju je

sudjelovalo 25 ispitanika različite dobi, spola, životnih navika te različite duljine radnog staža u tekstilnoj industriji, odnosno različite duljine izloženosti agensima koji su ispitivani, te 20 ispitanika u kontrolnoj skupini koja je po svim kriterijima osim po izloženosti testiranim agensima odgovarala ispitivanoj skupini. U navedenom istraživanju je utvrđena statistički značajna razlika u broju mikronukleusa ($p < 0,05$) između ispitivane i kontrolne skupine, što je još jedan pokazatelj potencijalnog štetnog djelovanja sličnih agenasa na humani genetički materijal (23). Boje su često kompleksne smjese koje mogu same po sebi sadržavati toksične sastojke, ali uz rad s bojama u bilo kojoj industriji, kao i u umjetnosti, neizbježno je korištenje i drugih toksičnih tvari, posebno otapala, kao što je terpentini.

Već je odavno prepoznato da likovni umjetnici često obolijevaju od najrazličitijih tegoba (kožna i plućna oboljenja, te sklonost mentalnim poremećajima), koje su povezane sa korištenjem raznih otapala, pigmenata, medija, fiksativa pa i samih boja koje su do nedavno sadržavale visoke količine teških metala, posebno olova, koje je dokazano izuzetno genotoksično (24). Naglađa se da je za napadaje depresije, deluzija i pokušaje samoubojstva Vincenta Van Gogha, svjetski poznatog slikara nizozemskog porijekla, odgovorno upravo intenzivno izlaganje bojama koje sadrže teške metale te toksično djelovanje terpentina (25). Ovim istraživanjem je testirano toksično djelovanje terpentina na ljudski genom, koji je još uvijek jedno od najčešće korištenih otapala u svakodnevnom radu likovnih umjetnika.

U ovom istraživanju je dokazano da se oštećenja na genetičkom materijalu ispitanika, a koja su zabilježena MN-testom, mogu većim dijelom pripisati upravo djelovanju terpentina, jer nije pokazana statistički značajna razlika u broju MN, NP, i CBPI, između ispitanika koji su koristili isključivo terpentini i ispitanika koji su uz terpentini koristili i druga, potencijalno toksična sredstva (dušična kiselina i nitro-razrjeđivač), a što je vidljivo iz Tablice 3.

U sustavnom pregledu koje je uključivalo više različitih istraživanja kako formaldehid utječe na ljudski genom primjenom mikronukleus testa, pokazano je kako je upravo populacija koja je profesionalno izložena formaldehidu ima statistički značajno povišen broj MN ($p < 0.0001$) u odnosu na kontrolnu skupinu u čak 62% slučajeva. Treba imati na umu da je formaldehid svrstan u prvi razred humanih karcinogena od Svjetske Zdravstvene Organizacije, te da je primjećen porast u vrijednostima mikronukleus testa sa duljim vremenskim periodom izloženosti što ukazuje na potencijalno kumulativan učinak na nestabilnost genoma kod kroničnog izlaganja (26). Također, u ovom istraživanju, analizom vremenske izloženosti terpentinu, dokazano je kako s duljim i intenzivnijim izlaganjem, svi

parametri genotoksičnosti i citotoksičnosti rastu. Pokazala se statistički značajna razlika između sve tri grupe ispitanika (Tablica 4.), a u koje su svrstani ovisno o duljini izloženosti, pa su tako u prvoj grupi, ispitanici koji koriste terpentini u radu manje od jedne godine; u drugoj grupi su ispitanici koji koriste terpentini više od jedne, ali manje od dvije godine; dok su u trećoj skupini ispitanici koji svakodnevno koriste terpentini više od dvije godine, što može također ukazati na kumulativnu nestabilnost genoma kod kroničnog izlaganja terpentinu. Kao i formaldehid, terpentini je u današnje vrijeme i dalje u širokoj primjeni u različitim djelatnostima, prvenstveno u umjetnosti te u proizvodnji boja i lakova kao i u drvnoj industriji, te je potrebno dodatno obratiti pažnju na njegove učinke kod profesionalne izloženosti.

Istraživanja su pokazala da svakodnevno korištenje i profesionalno izlaganje raznim sredstvima kao što je benzin, teški metali i ugljena prašina (27,28,29), ili pak anestetici u medicini (30), se ne smije shvatiti olako, te da je potrebno dodatno osvijestiti važnost zaštite na radu. U ovom istraživanju, ispitan je terpentini i njegov štetan utjecaj kod profesionalne izloženosti. Štetno djelovanje neke kemikalije ne mora biti trenutno vidljivo, a ipak može dugoročno i bitno utjecati na ljudsko zdravlje, ne uzimajući u obzir samo profesionalnu izloženost već i svakodnevnu izloženost genotoksičnim agensima u našoj okolini, kao što je utjecaj pasivnog pušenja i smoga (31), ili upotreba lijekova (32,33). Ovim istraživanjem je dokazano da terpentini može djelovati mutageno i potencijalno kancerogeno, jer kromosomske aberacije utvrđene metodom MN-testa, dokazano prethode displazijama i malignim promjenama (1,2).

Treba imati na umu da unatoč jasnim rezultatima koji su dobiveni ovim istraživanjem, ono je provedeno na relativno malom broju ispitanika. Za dodatnu potvrdu rezultata dobivenih u ovom istraživanju, potrebno je napraviti istraživanje na većem broju ispitanika.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Terpentini uzrokuju nastanak većeg broja MN
- Terpentini uzrokuju nastanak većeg broja NP
- Terpentini uzrokuju nastanak većeg broja NPM
- Terpentini djeluju genotoksično
- Terpentini djeluju citotoksično
- Štetni učinci terpentina na genetički materijal povećavaju se kod duljeg izlaganja
- Kod korištenja terpentina potrebno je provoditi mjere zaštite na radu

8. SAŽETAK

Ispitivanje genotoksičnosti terpentina primjenom mikronukleus testa

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genotoksični učinak terpentina i odrediti indeks proliferacije limfocita periferne krvi zaustavljanjem citokineze kod ljudi profesionalno izloženih terpentinu.

Nacrt studije: Kohortna studija.

Ispitanici i metode: Analizirani su limfociti 22 ispitanika koji svakodnevno koriste terpentin u radu, te limfociti 20 kontrolnih ispitanika. Bilježen je ukupan broj MN, broj nukleoplazmatskih mostova (NPM) i nuklearnih pupova (NP) te indeks proliferacije stanica (CBPI).

Rezultati: Terpentin uzrokuje statistički značajno povećani broj mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova, te značajnu citotoksičnost (Mann-Whitney U-test, $P < 0,05$). Genotoksičnost i citotoksičnost terpentina povećavaju se sa vremenom izlaganja (Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$).

Zaključak: Pokazano je da je mikronukleus test vrlo dobar pokazatelj genotoksičnog i citotoksičnog djelovanja terpentina.

KLJUČNE RIJEČI: citotoksičnost; genotoksičnost; likovna umjetnost; mikronukleus test; terpentin

9. SUMMARY

Evaluation of genotoxicity of turpentine through micronuclei test

Objectives: The aim of this research was to examine the genotoxic effect of turpentine, and to determine the proliferation index of peripheral blood lymphocytes by cytokinesis, in people professionally exposed to turpentine.

Study design: Cohort study

Participants and methods: The lymphocytes of 22 participants, who are daily exposed, through their work to turpentine were analyzed. The same procedure was followed for 20 participants in the control group. The total number of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds as well as cell proliferation index were recorded.

Results: Turpentine causes a significant increase in number of micronuclei and significant cytotoxicity -(Mann-Whitney U test, $P < 0,05$).

Genotoxicity and cytotoxicity of turpentine rise through extended time period of exposure -(Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$).

Conclusion: It was proven that micronucleus test is a very good indicator of genotoxic and cytotoxic action of turpentine.

KEY WORDS: artist exposure; cytotoxicity; genotoxicity; micronucleus test; turpentine

10. LITERATURA

1. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534:65–75.
2. Garaj – Vrhovac V: Analysis of mutations in somatic cells. *Arh High Rada Toksikol* 2000;51:112-24.
3. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Miquiore L, i sur. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutat Res.* 2016;770:12-25.
4. Kent JA,ur. Riegel's Handbook of Industrial Chemistry.8.izd. Van Nostrand Reinhold Company;1983.
5. Pande TK, Pani S, Hiran S, Rao VVB, Shah H, Vishwanathan KA.Turpentine poisoning: a case report.*Forensic Sci Int.*1994;65:47-9.
6. Leung AY. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics . New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1980.
7. Trease GE, Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy . 13th ed. London, England: Balliere Tindall; 1989.
8. Hrvatski zavod za toksikologiju i antidoping.Registar sigurnosno-tehničkih listova, deklaracija i uputa. Dostupno na adresi:<http://www.hzt.hr/stl-deklaracije-upute.html>. Datum pristupa:03.09.2017.
9. Boyd EL, et al. Home Remedies and the Black Elderly: A Reference Manual for Health Care Providers . Levittown, PA: Pharmaceutical Information Associates, Ltd.;1991.
10. Filipsson AF. Short term inhalation exposure to turpentine: toxicokinetics and acute effects in men. *Occup Environ Med* . 1996;53:100-5.
11. Morton JF. Major Medicinal Plants . Springfield, IL: Thomas Books; 1977.

12. Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Ţeljećić D, Gajski G, i sur. Micronucleus assay in Croatian general population. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2010;61:219-34.
13. Verschaeve L, Vanderkerken M, Kirsch-Volders M. C banding as a simple tool to discriminate micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain Technol.* 1998;63:351-4.
14. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88:1515-31.
15. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols.* 2007;2:1084-104.
16. Channarayappa, Ong T, Nath J. Citogenetic effects of vincristine sulfate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. *Environ Mol Mutagen.* 1992;20:117-26.
17. Parry JM, Parry EM. *Genetic Toxicology: Principles and Methods.* London: Humana Press; 2011;316-24.
18. Natajara AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutate Res* 2002;504:3-16.
19. Fučić A, Mijić A. In vitro i in vivo mikronukleus metode u genotoksikološkim istraživanjima. *Arh Hig Rada Toksikol.* 1999;50: 299–306.
20. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Pariz: 2012 13
21. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26;1:43-9.
22. Kopjar N, Kašuba V, Rozgaj R, Ţeljećić D. Antineoplastic drugs associated with occupational risks. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2010;61:121-146.
23. Sudha S, Shibily P, Shyn J, Kripa SK, Vellingiri B. Genotoxic Effects of Textile Printing Dye Exposed Workers in India Detected by Micronucleus Assay. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11:919-22.
24. Shah AJ, Lakkad BC, Rao MV. Genotoxicity in lead treated human lymphocytes evaluated by micronucleus and comet assays. *Indian J Exp Biol.* 2016;54:502-8
25. Źuskin E, Schachter EN, Mustajbegović J, Pucarín-Cvetković J, Lipozenčić J. Occupational health hazards of artists. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2007;15:167-77.

26. Costa S, Pina C, Coelho P, Costa C, Silva S, Porto B, i sur. Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A*. 2011;74:1040-51.
27. Nersesyan A, Kundi M, Waldherr M, Setayesh T, Mišik M, Wultsch G, i sur. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutat Res*. 2016;770:119-39.
28. Sinitsky MY, Minina VI, Gafarov NI, Asanov MA, Larionov AV, Ponasenko AV, i sur. Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2016;31:669-75.
29. Angelini S, Bermejo JL, Ravegnini G, Sammarini G, Hrelia P. Application of the lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay to populations exposed to petroleum and its derivatives: Results from a systematic review and meta-analysis. *Mutat Res*. 2016;770:58-72.
30. Souza KM, Braz LG, Noqueira FR, Souza MB, Bincoletto LF, Aun AG, i sur. Occupational exposure to anesthetics to genomic instability, cytotoxicity and proliferative changes. *Mutat Res*. 2016;791-2:42-8.
31. Cavalcante DN, Sposito JC, Crispim BD, Nascimento AV, Grisolia AB. Genotoxic and mutagenic effects of passive smoking and urban air pollutants in buccal mucosa cells of children enrolled in public school. *Toxicol Mech Methods*. 2017;27:346-51.
32. Cobanoğlu H, Coskun M, Cayir A, Coskun M. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of doxepin and escitalopram on human peripheral lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*. 2017;31:1-7.
33. Sekeroğlu V, Aksoy M, Atli SZ. Cytogenetic alterations in human lymphocyte cultures following exposure to ofloxacin. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40:140-5.

11. ŽIVOTOPIS

SARA KEVIĆ DEŠIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 31. srpnja 1988. godine u Zadru

Obrazovanje:

- 2003.-2009. - II gimnazija, Osijek
- 2013.-2017. - Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

12. PRILOZI

1. Obavijest za ispitanika
2. Informirani pristanak za sudionike istraživanja
3. Upitnik za sudionike istraživanja

1. Obavijest za ispitanika

Ispitivanje genotoksičnog učinka terpentina primjenom mikronukleus testa

Znanstveno istraživanje u Laboratoriju za medicinsku genetiku
Medicinskog fakulteta u Osijeku

Zamoljeni ste za sudjelovanje u istraživanju kojim ćemo pokušati utvrditi utjecaj svakodnevne izloženosti parama terpentina na nastanak mikronukleusa u limfocitima periferne krvi. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija svrha je pomoći Vam odlučiti želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest.

Mnogi fizički, kemijski i biološki faktori koji se nalaze u životnom i radnom okolišu imaju karcinogene i mutagene učinke, ali genetska predispozicija, životne navike i prisutnost takvih tvari u radnom okolišu mogu uvelike pridonijeti pokretanju štetnih procesa u ljudskom tijelu poput inicijacije, promocije i progresije koje dovode do nastanka neoplastičnih bolesti s ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje. Izloženost karcinogenim i mutagenim tvarima može dovesti do oštećenja stanice i do procesa koji mogu rezultirati malignom transformacijom te potencijalno neoplastičnim rastom i razvojem raka. Kako bi spriječili štetne učinke karcinogenih i mutagenih tvari na ljudsko zdravlje, potrebno je utvrditi njihovu prisutnost na radnom mjestu i poduzeti odgovarajuće mjere zaštite. Prevencija i rano otkrivanje tih tvari najvažniji su faktori u smanjivanju učestalosti i posljedica njihovih učinaka.

In vitro mikronukleus test najvažnija je citogenetička metoda koja se primjenjuje u nadzoru profesionalno izloženih populacija mutagenim ili kancerogenim kemikalijama. Mikronukleusi su indikatori klastogenog efekta (strukturne promjene kromosoma) ili poremećaja diobenog vretena. Povećani broj mikronukleusa u pojedinca može značiti njegovu povećanu osjetljivost na karcinogene tvari, može biti rezultat izloženosti genotoksičnim tvarima tijekom razdoblja razvoja stanica u ispitivanom tkivu.

Bit ćete zamoljeni za uzorak venske krvi koji će biti izvađen uz Vaše dopuštenje od strane kvalificiranog medicinskog osoblja. Na uzorku krvi neće pisati vaše ime, već šifra koja omogućava Vašu potpunu osobnu zaštitu tijekom istraživanja. Svi uključeni istraživači obvezuju se na potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka, te se Vaši osobni podaci neće pojavljivati niti u jednom znanstveno-istraživačkom dokumentu niti na bilo koji način biti dostupni ili objavljeni pod Vašim imenom. Jedini rizik kojemu Vas izlažemo je neugodnost pri vađenju krvi.

Vaša odluka o sudjelovanju u ovom istraživanju je dobrovoljna i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga.

Ispitivanje je predloženo Etičkom povjerenstvu za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek koji je nakon uvida u dokumentaciju odobrilo istraživanje. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

2. Informirani pristanak za sudionike istraživanja

Potvrđujem da sam dana _____, u Osijeku, pročitao/la ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/la priliku postavljati pitanja. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju.

Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika:

Ime i prezime (tiskanim slovima): _____

Potpis: _____

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:

Potpis: _____

Ime i prezime (tiskanim slovima): _____

3. Upitnik za sudionike istraživanja

Osijek, _____

Broj: _____

MIKRONULKEUS TEST - UPITNIK

Ime i

prezime: _____

Datum

rođenja: _____

Agensi s kojima radi i s kojima je radio (uključujući terpentin):

_____ od _____ do

_____ od _____ do

_____ od _____ do

naziv agensa

dani u tjednu

mj/god

mj/god

Pretrage sa zračenjem kojima je osoba bila podvrgnuta u zadnjih 12 mjeseci:

(RTG snimanje, dijaskopija, angiografija, scintigrafija, mamografija...)

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
mjesec i godina	vrsta pretrage i dio tijela

Preboljele bolesti (upisati godinu):	Herpes zoster: _____
	Meningitis: _____
	Virusni hepatitis: _____
	Mumps: _____
	Infektivna mononukleoza: _____

Primljena cjepiva u zadnjih 5 godina:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
mjesec i godina	vrsta cjepiva

Farmakoterapija (lijeka koji se uzimao unutar 12 mjeseci duže od 15 dana, uključujući i vitamine)

_____	_____	_____	

_____	_____	_____	

_____	_____	_____	

mjesec i godina lijeka	naziv lijeka	mjesec i godina	naziv

Fizikalna terapija (navedi vrstu zračenja- rendgen, kobalt, ultrazvuk,...):

_____	_____
_____	_____
_____	_____
mjesec i godina	vrsta zračenja

Oralni kontraceptivi:

od _____	do _____	_____

od _____	do _____	_____
_____	_____	_____
mjesec i godina	mjesec i godina	naziv sredstva

Narkotici: od _____ do _____

_____	_____	_____
mjesec i godina	mjesec i godina	naziv narkotika

Alkohol: Konzumira (zaokružiti): NE POVREMENO SVAKODNEVNO

Pušenje: od _____ do _____
 godina godina cigareta dnevno

Hobi koji uključuje fizičke napore, pesticide ili neke druge kemikalije (npr. sport, rad u vrtu ili sl.)

Obiteljska anamneza:

Kongenitalne / genske bolesti u obitelji (npr. Sy Down, mentalna retardacija,...): _____

Obiteljska povijest karcinoma: _____

Vlastoručni potpis

